

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN(11)Publication number : **04-295407**(43)Date of publication of application : **20.10.1992**

(51)Int.Cl.

A01N 63/00
C12N 1/20
//(C12N 1/20
C12R 1:38)(21)Application number : **03-083203**(71)Applicant : **NIKKO KYODO CO LTD**(22)Date of filing : **22.03.1991**(72)Inventor : **WAKIMOTO SATORU**
FURUYA SHIGETO**(54) MICROORGANISM CAPABLE OF CONTROLLING DISEASE INJURY OF GRAMINEOUS CROP AND METHOD FOR CONTROLLING DISEASE INJURY****(57)Abstract:****PURPOSE:** To provide a microorganism capable of controlling disease injury of gramineous crops and a method for controlling the disease injury by using the aforementioned microorganism.**CONSTITUTION:** New *Pseudomonas glumae* N7503 (FERM P-12105) effective in controlling disease injury of gramineous crops. A method for controlling the disease injury of the gramineous crops, especially controlling rice plant seedling rot by inoculating the aforementioned strain into rice plant seeds or adding and mixing the strain in soil is provided.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-295407

(43) 公開日 平成4年(1992)10月20日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 0 1 N 63/00	F	7106-4H		
C 1 2 N 1/20	A	7236-4B		
// (C 1 2 N 1/20				
C 1 2 R 1:38)				

審査請求 未請求 請求項の数4 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願平3-83203	(71) 出願人	000231109 日本鉱業株式会社 東京都港区虎ノ門二丁目10番1号
(22) 出願日	平成3年(1991)3月22日	(72) 発明者	脇本 哲 福岡県粕屋郡新宮町上府1592-648
		(72) 発明者	古屋 成人 福岡県福岡市東区筥松三丁目16-32 東荘 205号
		(74) 代理人	弁理士 藤野 清也

(54) 【発明の名称】 イネ科作物の病害防除微生物および病害防除方法

(57) 【要約】

【目的】 イネ科作物の病害防除微生物および該微生物を用いる病害防除方法

【構成】 イネ科作物の病害防除に有効な病原性のない新規なシュードモナスグルメ (*Pseudomonas glumae*) N7503 (微工研菌寄12105号)。該菌株をイネ種子に接種するかあるいは土壤に添加混合してイネ科作物病害、特にイネ幼苗腐敗症を防除する方法。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 イネ科作物の病害防除に有効な病原性のない新規シュードモナス グルメ (*Pseudomonas glumae*) N7503 (微工研菌寄第12105)。

【請求項2】 病原性のない新規シュードモナス グルメ (*Pseudomonas glumae*) N7503 (微工研菌寄第12105) をイネ種子に接種することを特徴とするイネ科作物の病害防除方法。

【請求項3】 病原性のない新規シュードモナス グルメ (*Pseudomonas glumae*) N7503 (微工研菌寄第12105) を土壌に散布することを特徴とするイネ科作物の病害防除方法。

【請求項4】 イネ科作物の病害防除がイネ幼苗腐敗症及びイネもみ枯細菌病の防除である請求項(2)～(3)のいずれかに記載の方法

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、イネ科作物の病害、特にイネ幼苗腐敗症及びイネもみ枯細菌病の防除に有効な新規微生物及びこの微生物を用いてイネ科作物の病害を防除する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 イネもみ枯細菌病菌 (*Pseudomonas glumae*) によって引き起こされる病気であるイネもみ枯細菌病は、日本、韓国、中国などの他、東南アジアのイネ栽培地域に広く分布し、イネの収量に重大な被害を与えている。当初、本病原細菌は、イネの穂のみに病気を起こす細菌であると考えられていたが、その後の研究により本細菌はイネの幼苗に対しても病原性を示すことが明らかにされた。幼苗に対する被害は、水稻栽培の特殊性に基づく育苗箱の普及に伴ってわが国の重大な問題となっている。従って、イネもみ枯細菌病菌についてこれまで発生生態の解明、栽培法と発病との関係及び防除法の開発など広範囲な研究が実施されている。しかしながら、今なお伝染経路や侵入感染機構に不明な部分もあって、まだ的確な防除法は確立されていない。現在、防除対策としては塩水選による罹病もみの除去、各種薬剤による種子消毒、及びカスガマイシン・キャプタン水和剤、ポリカーバメイト水和剤などの育苗箱施用等が挙げられている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 しかしこれらの薬剤は、効果の不安定なこと、病菌菌株によって効果の異なること、及び生育抑制の薬害が現れるなどのことから、実用化にあたっては、さらに検討しなければならないのが現状である。また抵抗性品種の利用も考えられているが、本細菌病に対する抵抗性遺伝子がイネに存在するかどうか不明確ではない。このように現在までに行われている防除法は、十分な効果を挙げていないのが現状であ

2

り、新しい防除法の開発が望まれている。

【0004】 近年、土壌伝染性の植物病害を防除する手段の一つとして、より自然に立脚した生物的防除方法の開発が重要視されている。中でも各種抗菌物質産生性の根圏微生物の利用に関する研究は世界各国で進められており、幾つかの成功例が報告されている。また病原性細菌から病原性を喪失あるいは除去した非病原性変異菌株を利用した研究も多い。これら非病原性菌株の中には病原性菌株と同様に宿主内で増殖し、生態学的に病原性菌株とほぼ同様な挙動を示すものも存在する。このような非病原性菌株で予め宿主植物体を前処理することにより、その後接種した病原性細菌の侵入を防ぎ、或いは増殖を抑制することにより、発病を抑制する可能性が考えられる。本発明者らは、このような考えに基づいて、非病原性イネもみ枯細菌病菌を利用することによってイネもみ枯細菌病を生物的に防除する方法について検討を重ね、本発明をなすに至った。

【0005】

【課題を解決するための手段】 すなわち、本発明は、イネ科作物の病害防除に有効で病原性のない新規シュードモナス グルメ (*Pseudomonas glumae*) に関する。また、さらに本発明は、この新規シュードモナスグルメをイネ種子に接種するかあるいは土壌に散布することによってイネ科作物の病害を防除する方法に関する。本発明におけるイネ科作物の病害とは、イネ幼苗腐敗症及び/またはイネもみ枯細菌病をいう。本発明における新規シュードモナス グルメは、微工研に、微工研菌寄第12105号として寄託されている。また、本発明では、この菌株を放射線、化学薬品等で変異させた菌株も、イネ科作物の病害が防除でき、病原性のない限り、本発明の菌株のなかに包含される。

【0006】 この新規シュードモナス グルメをイネ種子に接種する場合は、菌株濃度が $10^8 \sim 10^{10}$ cfu/ml の懸濁液に、イネ種子を浸漬することにより行うことが好ましい。また、新規シュードモナス グルメを土壌に散布して防除する場合は、 $10^7 \sim 10^{10}$ cfu/g 土壌の菌体濃度になるように散布することが好ましい。

【0007】 本発明者らは、福岡地方の田で生育させたイネからイネもみ枯細菌病に侵されたもみを選別し、これを70%のエタノール水溶液に数秒浸漬した後、有効塩素濃度3%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液に5分間浸し、滅菌蒸留水で水洗した後、すりつぶし、これをPSA平板培地に展開して、これからイネもみ枯細菌を47菌株分離した。

【0008】 これらのイネもみ枯細菌は、次の菌学的性質を有する。桿菌状で、極毛を有する。好気性で、生育適温は30～35℃、40℃でも生育可能。コロニーは灰白色を呈する。キング培地で生育可能。ゼラチン液化、硝酸塩還元、リトマスミルク還元、アンモニア産

生、硫化水素産生、カタラーゼ、レシチナーゼは、いずれもプラス。インドール産生、MR反応、オキシターゼは、いずれもマイナス。

【0009】次に、このなかからイネばかりでなく他の植物体にも病原性を持たない点でのみ菌学的性質が相違し、その他の点ではイネもみ枯細菌病と同様の性質を示す非病原性イネもみ枯細菌の選択を行なった。

【0010】この選択についてさらに詳細に説明する。

1. 非病原性イネもみ枯細菌病菌の選択

イネもみ枯細菌病菌はイネの幼苗及び穂を侵す病原細菌であるため、たとえ発病抑制効果が認められても、これをそのまま生物的防除に利用することは危険である。しかし、この菌は *in vitro* において病原性を喪失し易い性質をもっており、保存中あるいは継代培養中に病原性を喪失することもある。一方、本発明者らは、この菌がイネに対する病原性の他、ジャガイモ、ニンジン等の組織切片を腐敗させる性質を有する事を見出した。そこで全ての作物に対して非病原性の菌株を選抜する目的で本菌の各種作物に対する病原性を検討した。

【0011】植物材料としては、ジャガイモ（メークイン）、ニンジン（品種不明）及びトマト苗（東光）、イネ種子（あそみのり）を実験に供試した。各種野菜組織に対する腐敗能の検定は次の方法で行った。各種野菜組織を3%次亜塩素酸ナトリウム（アンチホルミン）に15分間浸漬することによって表面殺菌を行い、その後滅*

*菌水で十分に水洗して滅菌メスで厚さ約5mmに切断し、これをろ紙を敷いた直径9cmの滅菌シャーレに置き、滅菌水を5ml入れ、PSA斜面培地に30℃で48時間培養したイネもみ枯細菌病菌を切断面の中央部に1白金耳量接種した後、30℃に48時間静置し、腐敗能の有無を検討した。トマト苗に対する病原性の検討は、PSA斜面培地に30℃で48時間培養したイネもみ枯細菌病菌の各菌株を滅菌した白金耳で斜面からかきとり、これを予め70%エタノールで表面殺菌したトマト苗（播種後3週間）の茎に多針接種することにより行った。イネに対する病原性の検討は次のように行った。すなわち、供試品種あそみのりの種子を3%次亜塩素酸ナトリウム（アンチホルミン）で30分間消毒後、充分水洗し、25℃で2日間浸漬した。この種子60粒を直径9cmの滅菌シャーレにとり、これに濃度約10⁸ cfu/mlの細菌懸濁液15mlを注入し、30℃で24時間浸漬接種した。その後、オートクレープで滅菌したくみあい培土（三井東圧製）80gを入れ、滅菌蒸留水30mlを灌水した、60×60×45mmのプラスチック製容器に播種し、種子がかくれる程度に同くみあい培土で覆土し、32℃の接種箱中（湿度100%）で2日間育苗した。さらに、25℃の空調温室で緑化した後接種15日目に発病の有無と程度を調査した。

【0012】

【表1】

各種植物に対するシュードモナス グルメ 菌株の病理又は腐敗活性

菌 株				イ ネ	ジャガイモ	ニンジン	ト マ ト 苗
N750 752	YN7805 805	YN7825	750	-	-	-	-
N7501 8012 111 Ku8103 Ku8111 Ku8115 Ku8120	N7505 8015 2 Ku8104 Ku8112 Ku8116 Ku8121	So-1 8028 Ku8101 Ku8105 Ku8113 Ku8117 Ku8122	8001 1 Ku8102 Ku8105 Ku8114 Ku8119 Ku8123	+	+	+	-
N7502 P1-22-4	YN7810	P1-22-1	P1-22-3	-	-	+	-
N7401	8020			-	+	+	-
N7503	742			-	-	-	-
806	P1-22-2			+	-	+	-

【0013】結果は表1に示した通りである。イネに対して病原性を示さない菌株が15菌株存在した。トマトに対する病原性は供試した全ての菌株で認められなかった。各種野菜組織に対して腐敗能を示さずかつトマト、イネに対しても病原性を示さない菌株8菌株、即ち、N7504、N7503、YN7810、YN7805、YN7825、750、752、805が選抜できた。また、ジャガイモに対する腐敗能とイネに対する病原性との間には供試した47菌株において高い関連性が認め

られた。これらの15菌種は継代培養あるいは保存中にイネに対する病原性が喪失したものと考えられる。そしてこれらの非病原菌は、ジャガイモ等その他の植物に対しても病原性を示すことはない。

【0014】次に、これら非病原性細菌がイネもみ枯細菌病菌で起こるイネ幼苗腐敗症の発病を抑制することができるか否かについて検討した。

2. 非病原性イネもみ枯細菌病菌によるイネ幼苗腐敗症の発病抑制効果

5

病原性菌株4菌株 (Ku8111、2、So-1、Ky82-34-2) 及び非病原性菌株5菌株 (N7503、N750、YN7810、YN7825、805) を実験に供試した。イネ品種はあそみのりを用いた。非病原性イネもみ枯細菌病菌によるイネ幼苗腐敗症の発病抑制効果の検定を次の方法で行った。すなわち、水保存菌をYPD A斜面培地に移植し、30℃で48時間培養後、滅菌蒸留水10mlに懸濁 (濃度: 約 10^8 cfu/ml)、これをYPD液体培地200mlに加え、30℃で48時間振とう培養した。その後、3、600×gで20分間遠心を行い、得られた菌体を滅菌蒸留水に約 10^{10} cfu/mlになるように懸濁し、これにメチルセルロースを1.5%になるように加えた。イネ種子は3%次亜塩素酸ナトリウム (アンチホルミン) で30分表面殺菌した後、滅菌水で十分に洗浄し、メチルセルロースを含む細菌懸濁液に30℃で24時間浸漬処理した。対照として細菌を含まない1.5%メチルセルロース液に浸漬した種子を用いた。病原性菌株は、非病原性菌株と同様に培養後、約 10^8 cfu/mlの濃度になるように滅菌水で調節し、これを接種源とした。非病原性菌株及び病原性菌株の菌濃度は実験の度にYPD A平板培地を用い、希釈平板法に従って求めた。非病原性菌株液に浸漬したイネ種子は、滅菌したくみあい培土 (三井東圧製) 約80gの入った60×60×45mmのプラスチック製容器に60粒ずつ播種し、覆土 (20g) した後、接種源である病原性菌株の細菌懸濁液を10mlずつ灌注接種した。処理した容器は、32℃で48時間接種箱 (湿度: 100%) に入れて催芽させた後、25～30℃の空調温室あるいは28℃の植物育成チャンパー内に置き、緑化させた。灌水は1日1回行った。発病度の判定は接種後15日目に行った。全ての実験は2回以上反復した。発病度の検定は、図1に示すように病徴の激しさの度合いによって、0～5の6段階 (発病度

6

0は健全苗、1は健全苗と背丈は変わらないが葉身にクロロシスが現れたもの、2は健全苗より背丈が低く、葉鞘基部のネクロシスが見られるもの、3は葉身のクロロシス、葉鞘基部にネクロシスに加えて、全身が異常形態を呈しているもの、4は本葉第1葉しか展開しておらず全体的に退緑したもの、5は腐敗枯死したもの) に分けて調査し、発病度は各区60粒の平均値をもって示した。

【0015】実験の結果を表2に示す。この表から明らかなように、非病原性菌株でイネ種子を浸漬処理することによってイネ幼苗腐敗症の発病が抑制されることが明らかとなった。しかし、その発病抑制効果の程度は非病原性菌株-病原性菌株の組み合わせによって著しく異なり、全く発病抑制効果の見られないものから高い発病抑制効果を示すものまで存在した。すなわち、病原性菌株So-1に対しては、非病原性菌株N7503、N750、YN7825、805によって発病が抑制された。他方、YN7810で処理しても抑制効果は得られなかった。病原性菌株2に対しては、N7503、805で発病抑制効果が認められたが、N750、YN7810、YN7825では全く抑制されなかった。病原性菌株Ky82-34-2に対しては、非病原性菌株N7503で処理した場合だけに発病抑制効果が認められ、非病原性菌株N750、YN7810、YN7825、805で処理しても発病は抑制されなかった。さらに病原性菌株Ku8111に対しては、N7503、YN7810、805で発病抑制効果が認められ、N750では弱く、YN7825では効果は得られなかった。この結果、非病原性菌株N7503でイネ種子を処理することによってイネ幼苗腐敗症の発病を抑制できることが確認された。

【0016】

【表2】

7

8

シュードモナス グルメの非病原性菌株で前処理した
イネ幼苗腐敗症の発病抑制効果

前処理 ^{a)}	接種菌 ^{b)}	発病抑制効果
N7503	So-1	0.2
	2	0.0
	Kyu82-34-2	0.2
	Ku8111	0.9
N750	So-1	0.3
	2	4.2
	Kyu82-34-2	4.8
	Ku8111	3.4
YN7810	So-1	0.6
	2	4.6
	Kyu82-34-2	4.8
	Ku8111	1.2
YN7825	So-1	0.3
	2	4.7
	Kyu82-34-2	4.6
	Ku8111	4.4
805	So-1	0.6
	2	0.3
	Kyu82-34-2	4.1
	Ku8111	1.1
Control	So-1	4.9
	2	5.0
	Kyu82-34-2	4.9
	Ku8111	4.9

- a) 濃 度 : N7503: 3.8×10^{10} , N750: 7.4×10^{10}
YN7810: 3.1×10^{10} , YN7825: 2.4×10^{10}
805: 6.0×10^{10} , それぞれcfu/mlで示す。
b) 濃 度 : So-1: 2.6×10^7 , 2: 0.9×10^7 , Kyu82-34-2: 1.2×10^7
Ku8111: 1.3×10^7 , それぞれ土壌中のcfu/gで示す。

【0017】3. 浸漬処理用の菌濃度と発病抑制効果との関係

そこで、この非病原性菌株N7503の菌濃度と発病抑制効果との関係について検討した。非病原性菌株としてN7503を、また病原性菌株としてSo-1を供試した。発病抑制効果の検定は前記した方法に従って行った。すなわち、水保存してある各菌株をYPD A平板培地に広げて単一コロニー分離を行い、これを200mlのYPD液体培地の入った坂口フラスコに接種し、30℃で48時間振とう培養を行い、遠心(8,000×g, 20分間)によって得られた菌体を滅菌蒸留水に約 10^{10} cfu/mlになるように懸濁し、これを10倍段階希釈することにより約 10^{10} 、 10^8 、 10^6 cfu/mlの細菌懸濁液を作成した。この各濃度の非病原性菌株N7503の懸濁液にメチルセルロースを1.5%になるように加え、これに3%次亜塩素酸ナトリウム(アンチホルミン)で表面殺菌を行ったイネ種子を浸漬し、30℃で24時間静置後、滅菌したくみあい培土8

0gの入った容器に60粒ずつ播種し、20gのくみあい培土で覆土した後、各濃度の病原性菌株So-1の細菌懸濁液を10mlずつ灌注接種を行い、30℃で48時間接種箱に置き、28℃で1日12時間照明に調節した植物育成チャンバー内に入れ、15日目に発病度の検定を行った。

【0018】この結果を表3に示した。表3から明らかなように、非病原性菌株の濃度が 10^{10} cfu/mlの細菌懸濁液でイネ種子を処理した場合、土壌中の病原性菌株の菌濃度が 10^{10} cfu/gと高濃度であっても高い発病抑制効果が示された。しかし、非病原性菌株の菌濃度が 10^8 cfu/ml以下になり、さらに、病原性菌株の菌濃度が 10^6 cfu/gと低くなると発病抑制効果は得られず、効果を得るためには高濃度(10^{10} cfu/ml)の非病原性菌株の懸濁液で処理する必要があることが明らかとなった。

【0019】

【表3】

浸漬処理用の菌濃度と発病抑制効果との関係

非病原性菌株 N7503(cfu/ml)	病原性菌株 So-1(cfu/g of soil)	発病抑制効果
10^{10}	10^9	0.2
10^{10}	10^7	0.1
10^{10}	10^5	0.0
10^8	10^9	4.8
10^8	10^7	4.5
10^8	10^5	3.8
10^6	10^9	5.0
10^6	10^7	5.0
10^6	10^5	4.5
	10^9	5.0
	10^7	5.0
	10^5	4.7

【0020】さらに、本発明では、本発明のシュードモナス グルメN7503がイネ科作物の病害防除に使用できることを立証するため、次の試験を行った。

【試験1】 非病原性N7503菌株の各種病原性菌株に対する発病抑制効果

非病原性菌株N7503の持つ発病抑制効果が、さらに多くの他の病原性菌株に対しても同様に高い発病抑制効果を示すか否かについて検討を行った。

【0021】すなわち、九州大学植物病理学教室保存のイネもみ枯細菌病菌の菌株の内、強い病原性を示すKu*

*8106、Ku8121、III、8001、8017、I、Ku8105の計5菌株を供試し、N7503菌株の発病抑制効果を検討した。発病抑制試験は前記の方法によって行った。この結果は表4に示したように非病原性菌株N7503は供試した全ての病原性菌株に対して強い発病抑制効果を持つ菌株である事が明らかとなった。

【0022】

【表4】

非病原性N7503 菌株の各種病原性菌株に対する発病抑制効果

イネ種子浸漬	病原性菌株 ^{a)}						
	Ku8106	Ku8121	III	8001	8017	I	Ku8105
N7503 ^{b)}	0.1	0.1	0.1	0.3	0.2	0.3	0.0
1.5% methylcellulose	4.6	4.2	3.8	3.6	4.1	3.9	3.9

a) 濃度: Ku8106: 1.9×10^7 , Ku8121: 7.4×10^6 , III: 2.1×10^7 , 8001: 6.1×10^6 , 8017: 1.6×10^7 , I: 6.5×10^7 , Ku8105: 6.4×10^6 , 土壌中のcfu/g.を示す。
respectively.

a) 濃度: N7503: 4.1×10^{10} cfu/ml.

【0023】

【試験例2】 カスガマイシン・キャプタン水和剤との発病抑制効果の比較本発明のN7503菌株のイネ幼苗腐敗症の防除効果と、従来イネ幼苗腐敗症の防除に有効なイネ育苗箱施用剤として報告されているカスガマイシン・キャプタン水和剤の防除効果とを比較した。

【0024】すなわち、病原性菌株So-1と非病原性菌株N7503との組み合わせで、イネ品種としてはあそみのりを用いて実験を行った。発病抑制試験は前記方法によった。カスガマイシン・キャプタン水和剤は、1容器当たり200倍希釈液(原体換算でカスガマイシン1.2g+キャプタン1.2mg)10mlを、播種後覆土前に滅菌土壌に灌注することにより処理した。

【0025】この結果を表5に示す。N7503でイネ種子を前処理することにより得られる発病抑制効果は、カスガマイシン・キャプタン水和剤を土壌1当たり0.4mgで施用した場合に得られる発病抑制効果とほぼ同程度のものではあった。しかし、カスガマイシン・キャプタン水和剤で処理した区では、N7503の前処理または1.5%メチルセルロースのみで処理した区と比べて、イネ幼苗の苗丈が低いなど、若干の成育抑制が見られる場合があった。非病原性菌株で前処理したものは、防除薬剤とほぼ同程度の効果が得られ、その生育は無処理区との間に殆ど差は認められなかった。

【0026】

【表5】

生物学的方法と化学的方法とによる発病抑制効果^{a)}の比較

処理方法	濃 度	発病抑制効果
非病原性菌N7503 による モミの処理	モミに 10^{10} cfu/ml	0.5
カスガマイシン・キャプタン 水和剤による土壌の処理	土壌に0.4mg/g	0.0
無処理		4.2

a) 接種菌：シュードモナス グルメ So-1 菌株、濃度 1.9×10^7 cfu/g (土壌)

【0027】

【試験3】 発病抑制効果の品種間差異

本発明の非病原性菌株が、イネ品質あそみのりがイネ幼苗腐敗症の発病を顕著に抑制することが明らかとなったので、この効果が他のイネの品種においても認められるかどうか検討した。

【0028】すなわち、イネ品種として、あそみのり、太刀風、黄玉、中国45号、クジュウ、愛知旭、農林29号、IR64、イナバワセの計9品種を供試した。細菌は非病原性菌株としてN7503、YN7810及び805を、また病原性菌株としてSo-1、Ky82-34-2及び2を用いた。非病原性菌株による種子処理、病原性菌株の接種及び効果の検定は前記した発病抑制試験に示した方法で行った。

【0029】この結果を表6及び表7に示す。実験結果から非病原性菌株による発病抑制効果には品種間差異が存在することが明らかとなった。非病原性菌株805と病原性菌株Ky82-34-2の組み合わせにおいては、太刀風、黄玉、中国45号及びクジュウで発病抑制

効果が認められたが、他の品種（あそみのり、愛知旭、農林29号、IR64、イナバワセ）においては全く発病は抑制されなかった。非病原性菌株805と病原性菌株2の組み合わせでは、愛知旭、中国45号で発病抑制効果は認められず、農林29号において若干の発病抑制が認められ、他の6品種（あそみのり、太刀風、黄玉、クジュウ、IR64、イナバワセ）においては高い発病抑制効果を示した。また、非病原性菌株YN7810と病原性菌株So-1の組み合わせでは、太刀風、クジュウ、イナバワセにおいては全く発病抑制効果は得られず、他の品種（あそみのり、黄玉、中国45号、愛知旭、農林29号、IR64）では高い発病抑制効果が得られた。非病原性菌株N7503と病原性菌株So-1の組み合わせでは、全ての品種において発病を抑制することが明らかとなった。以上のことから発病抑制効果発現には非病原性菌株、病原性菌株及びイネ品種の3者の間の特異的な関係が関与することが判明した。

【0030】

【表6】

発病抑制効果の品種間差異

処理菌	接種菌	品 種				
		あそみのり	太刀風	クジュー	中国45号	黄玉
病原性	So-1	3.7	2.7	0.9	4.9	1.0
菌株	Kyu82-34-2	3.4	4.4	1.4	0.4	4.3
(Control)	2	4.9	5.0	4.9	4.9	4.9
非病原性	N7503 + So-1	0.3	0.1	0.0	0.1	0.1
菌株	YN7810 + So-1	0.4	2.0	1.5	0.4	0.3
病原性	805 + Kyu82-34-2	2.5	0.6	0.7	1.5	0.2
菌株	805 + 2	0.1	0.3	0.2	3.6	0.1
(Treatment)						
非病原性	N7503	0.0	0.3	0.0	0.0	0.1
菌株	YN7810	0.3	0.1	0.1	0.0	0.2
(Control)	805	0.2	0.3	0.2	0.0	0.1

濃度: So-1: 3.0×10^7 , 2: 2.6×10^7 , Kyu82-34-2: 1.2×10^7 , cfu/g
(土壌当り)

N7503: 4.0×10^{10} , YN7810: 4.1×10^{10} , 805: 3.7×10^{10} , cfu/ml

【表7】

発病抑制効果の品種差異

処理菌	接種菌	品 種			
		イナバワセ	愛知旭	農林29号	IR64
病原性	So-1	3.4	2.4	1.3	2.8
菌株	Kyu82-34-2	4.5	4.5	4.3	5.0
(Control)	2	4.6	4.1	4.5	4.8
非病原性	N7503 + So-1	1.0	0.8	0.4	0.9
菌株	YN7810 + So-1	2.3	0.6	0.2	0.3
病原性	805 + Kyu82-34-2	4.5	3.3	5.0	5.0
菌株	805 + 2	0.4	3.9	2.8	0.5
(Treatment)					
非病原性	N7503	0.0	0.0	0.0	0.4
菌株	YN7810	0.1	0.2	0.3	0.4
(Control)	805	0.0	0.0	0.0	0.0

濃度: So-1: 3.3×10^7 , 2: 2.3×10^7 , Kyu82-34-2: 8.1×10^6 , cfu/g
(土壌当り)

N7503: 3.8×10^{10} , YN7810: 3.3×10^{10} , 805: 3.9×10^{10} , cfu/ml

N7503: 3.8×10^{10} , YN7810: 3.3×10^{10} , 805: 3.9×10^{10} , cfu/ml

【0031】

【試験4】 イネ幼苗腐敗症発病抑制機作の検討

1. さらに、本発明では、非病原性イネもみ枯細菌病菌によるイネ幼苗腐敗症発病抑制機作を知るために、まず、非病原性菌株の病原性菌株に対する抗菌活性を検討した。すなわち、非病原性菌株N7503、N750、805、YN7810、YN7825及び病原性菌株Ku8111、2、So-1、Kyu82-34-2を供試した。抗菌物質の産生性及び活性の検定にはYPD平板培地を用い、プレートクロロホルム法及びUV照射の2通りの方法で行った。UV照射は、培養後コロニーの形成が認められたシャーレの上蓋を外し、15Wの殺菌ランプ(東芝GL-15)で高さ30cmから3時間行った。その後、30℃で24時間静置し、指示菌である病原性菌株を重層し、30℃で培養後コロニーの周囲に形成される阻止帯の有無により抗菌物質産生性を検討した。

【0032】この結果、供試した非病原性菌株N7503及びN750において抗菌活性が認められた。これらの菌株が形成した阻止帯の巾は数mm程度の小さなものであった。しかし、非病原性菌株が病原性菌株に対して培地上で示す抗菌活性と発病抑制効果との間には直接的な関連性は認められなかった。

【0033】2. 次にイネもみ枯細菌病菌以外の既知植

物病原細菌及び腐生菌についてイネ幼苗腐敗症の発病抑制効果を検討した。九州大学植物病理学教室において保存してある植物病原細菌 *Agrobacterium tumefaciens* Ku7411、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* N7129、*Clavibacter michiganense* pv. *michiganense* N6601、*Bacillus subtilis* ATCC 6633、*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* I、及び *Pseudomonas fluorescense* p-15を供試した。これらの細菌はそれぞれPSA斜面培地上に30℃で48時間培養後、200mlのYPD液体培地の入った坂口フラスコに移植し、30℃で48時間培養し、遠心(8,000×g、20分)によって菌体を集め、これを約 10^{10} cfu/mlになるように滅菌水に懸濁し、前処理に用い、前記した発病抑制試験を行った。

【0034】この結果、イネ幼苗腐敗症の発病抑制効果は、非病原性イネもみ枯細菌病菌のみによって示された。供試したその他全ての細菌では発病抑制効果が全く認められないことが明らかとなった。

【0035】3. また、非病原性菌株の培養濾液でイネ種子を処理した場合の発病抑制効果について検討した。

すなわち、非病原性菌株N7503をYPD液体培地（200ml）に接種し、30℃で4日間振とう培養後、遠心（8,000×g、20分）し、上清を孔径0.2μmのメンブランフィルターを通し完全に除菌することにより非病原性菌株培養濾液を得た。この培養濾液に表面殺菌したイネ種子を24時間浸漬し、これを病原性菌株So-1が土壌1g当たり 2.6×10^7 cfuになるように接種した汚染土壌に播種し、15日目に発病度を調査した。

【0036】その結果、培養濾液の原液を用いた場合も、1/100希釈した場合も殆ど差のない発病度を示し、培養濾液による発病抑制効果は全く認められなかった。

【0037】4. さらに、非病原性イネもみ枯細菌病菌によるイネ幼苗腐敗症の発病抑制効果が死菌によっても認められるか否かについて検討した。供試菌株として非病原性菌株N7503、及び病原性菌株So-1を用いた。PSA斜面培地上に30℃で48時間培養した非病原性菌株N7503を約 10^{10} cfu/mlになるように滅菌蒸留水に懸濁した後、次に示す3通りの方法によって死菌の作成を行った。①100℃で10分間の熱処理、②滅菌シャーレに細菌懸濁液を2~3mlずつ入れ、15Wの殺菌ランプ（東芝GL-15）で30cmの高さから4時間照射、③細菌懸濁液約10mlを50mlのピーカーに取り、これをクロロホルム約200mlの入った2,000mlのピーカーに入れアルミニウム箔で密封し、スターラーで攪拌しながら4時間の蒸気処理を行った。発病抑制試験は前記した方法によって行なった。

【0038】これらは、いずれの場合においても発病抑制効果が全く認められなかった。このことから非病原性菌株による発病抑制効果は生菌によってのみ示される事が明らかとなった。

【0039】5. さらに、種子処理法及び接種法の違いが発病抑制効果に及ぼす影響について検討した。すなわち、高い発病抑制効果の認められる非病原性菌株N7503と病原性菌株So-1の組み合わせを用いて行った。非病原性菌株と病原性菌株の混合液（濃度N7503: 6.3×10^9 cfu/ml、So-1: 2.3×10^7 cfu/ml）及び非病原性菌株、病原性菌株の単独液にメチルセルロースを1.5%になるように加え、これらの液に表面殺菌したイネ種子を浸漬し、30℃で24時間保った。処理した種子を、100℃のくみ

あい培土の入った容器に60粒ずつ播種し、32℃で湿度100%の接種箱に48時間保った後、28℃、1日12時間照射の植物育成チャンパー内に置き、播種後15日目に発病度の検定を行った。また、濃度 6.3×10^9 cfu/mlの非病原性菌株懸濁液及び濃度 2.7×10^7 cfu/mlの病原性菌株懸濁液を1容器（100gのくみあい培土）当り10mlずつ混合し、この土壌に表面殺菌した種子を播種した後、上記と同様に播種15日目に発病度の調査を行った。さらに、病原性菌株接種後に非病原性菌株で処理した場合の発病抑制効果の検定を以下の方法で行った。表面殺菌を行ったイネ種子を病原性菌株So-1の細菌懸濁液（濃度: 2.3×10^8 cfu/ml）で種々の時間（10分、24、48、72、96、102時間）浸漬接種後、100gのくみあい培土の入った容器に60粒ずつ播種し、非病原性菌株N7503の細菌懸濁液（濃度: 約 10^{10} cfu/ml）を10mlずつ灌注し、32℃で湿度100%に保った接種箱に48時間入れ、その後28℃で1日12時間照射の植物育成チャンパー内に置き、育苗した。発病後の検定は播種後15日目に行った。

【0040】実験の結果を表8及び表9に示す。表8に示したように、病原性菌株を単独でイネ種子にコーティングした区では全ての固体が完全に腐敗・枯死したのに対し、非病原性菌株と病原性菌株の混合液でイネ種子をコーティングした場合、発病度0.7を示し、高い発病抑制効果が認められた。また、濃度 2.3×10^6 cfu/gの病原性菌株で汚染した土壌に播種した場合には3.6の発病度を示したのに対して、この土壌に非病原性菌株が 6.3×10^8 cfu/gの濃度で存在した場合には発病度が0.6と顕著な抑制効果を示した。また、表9から明らかなように、先に病原性菌株So-1をイネ種子に浸漬接種し、非病原性菌株N7503が土壌1g当たり約 10^9 cfuの菌量で存在している土壌に播種した場合にも発病は顕著に抑制された。さらに、イネ種子を病原性菌株の細菌懸濁液に120時間浸漬接種した場合でも非病原性菌株を添加した土壌に播種すれば発病が抑制されることが明らかとなった。この結果から発病を防止するには、イネ種子を本発明の非病原性菌株で被覆するかあるいはイネ種子を播種する土壌に本発明の非病原性菌株を添加するとその効果を十分に達成することができる。

【0041】

【表8】

19

20

種子処理法及び接種法の違いが発病抑制効果に及ぼす影響(1)

処理法	濃 度		発病抑制効果
	N7503 (非病原性)	SoI (病原性)	
種子浸漬		2.3×10^7 cfu/ml	5.0
	6.3×10^9 cfu/ml		0.7
	6.3×10^9 cfu/ml	2.3×10^7 cfu/ml	1.3
土壌処理		2.3×10^6 cfu/g 土壌	3.6
	6.3×10^9 cfu/g 土壌		0.6
	6.3×10^9 cfu/g 土壌	2.3×10^6 cfu/g 土壌	0.3
種子浸漬 + 土壌処理	6.3×10^9 cfu/ml	2.3×10^6 cfu/g 土壌	0.8

【表9】

種子処理法及び接種法の違いが発病抑制効果に及ぼす影響(II)

病原菌 中に その 浸漬	土壌に 非病原菌 の添加	発病抑制効果					
		処理時間 (浸漬)					
		10min	24hr	48hr	72hr	96hr	120hr
So-1	無処理	5.0	4.3	3.8	5.0	4.7	5.0
So-1	N7503	0.4	0.5	0.1	0.2	0.5	0.3
無処理	N7503	0.3	0.5	0.5	0.5	0.5	0.2

【0042】6. またさらに、非病原性菌株によるイネ幼苗腐敗症の発病抑制効果の機作を明らかにする目的で、イネ発芽液中及び栄養分の極端に限られている滅菌水中における非病原性菌株と病原性菌株との競合関係について検討を行った。非病原性菌株としてN7503、病原性菌株としてストレプトマイシン耐性のSo-1-SRを用いた。イネ発芽液は次のようにして調整した。即ち、3%次亜塩素酸ナトリウム（アンチホルミン）で90分間表面殺菌した種子を滅菌水で十分に洗浄後、滅菌水50mlの入った100mlの三角コルベンに10粒ずつ入れ、30℃で1日12時間照明の植物育成チャンバー内に7日間置き、その後滅菌ピンセットでイネ植物体を除去、メンブランフィルター（孔径0.2μm）を通すことにより完全に除菌した液をイネ発芽液とした。この発芽液を100mlの三角コルベンに28mlずつ入れ、これに供試菌を所定の濃度（N7503： 1×10^7 cfu/ml、So-1-SR： 3×10^7 cfu/ml）になるように接種した後、30℃で静置培養し、経時的にYPDA及びストレプトマイシン500ppm含有YPDA培地を使用する希釈平板法により細菌の定量を行った。イネ発芽液の代わりに滅菌蒸留水を用いたものを対照とした。

【0043】病原性菌株So-1-SRをイネ発芽液中に 3×10^7 cfu/mlになるように単独接種して培養した場合、その菌数は培養2日目に 1×10^7 cfu/

mlに達し、その後若干の減少が見られたが、培養15日目まで約 10^7 cfu/mlのほぼ一定の菌量で生存した。非病原性菌株N7503と混合培養した場合、病原性菌株So-1-SRの増殖は著しく抑制され、培養2日目に単独培養の菌数に比べて約1/100、培養5日目には約1/10となり、その後15日目まで約1/10の濃度で推移した。非病原性菌株N7503の増殖は病原性菌株So-1-SRとの混合培養によっても減少せず、単独培養の場合とほぼ同様の増殖パターンを示した。また、滅菌蒸留水中においてもイネ発芽液中の増殖パターンと同様の傾向が認められた。すなわち、混合培養において病原性菌株So-1-SRの増殖は抑制され、培養2日目から15日目まで単独培養の場合と比べて約1/10の菌量で推移した。

【0044】7. またさらに非病原性菌株でイネ種子を処理することにより病原性菌株によるイネ幼苗腐敗症の感染及び発病が抑えられる。この場合、イネもみにおいて病原性菌株及び非病原性菌株がどのように消長するかについて検討を行なった。菌株は発病抑制効果の認められる組み合わせとして非病原性菌株N7503と病原性菌株2-SR及び効果の認められない組み合わせとして非病原性菌株YN7810と病原性菌株2-SRを供試した。イネ品種あそみのりの種子から外穎と内穎を取り除き、3%次亜塩素酸ナトリウム（アンチホルミン）で90分間表面殺菌し、滅菌蒸留水で十分に洗浄した。こ

21

の種子を0.5%の素寒天20mlの入った100mlの三角コルベンに10粒ずつ播種し、非病原性菌株(濃度:約 10^{10} cfu/ml)及び病原性菌株(濃度:約 10^8 cfu/ml)の混合液を2ml及び各細菌液を2倍に希釈した単独液を2mlずつ接種した。その後25℃で34,000~40,000 lux照明の条件下で育苗し、2日間隔で各菌の定量をYPD A平板培地及びストレプトマイシン100 ppm含有YPD A平板培地を用いて行った。

【0045】この結果、病原性菌株2-SRを単独で接種した区においては、時間の経過とともに増殖し、接種後10日目には1種子当たり約 10^7 cfuの菌量に達した。しかし、発病抑制効果を示す非病原性菌株N7503との混合培養においては、病原性菌株2-SRは接種後10日目においても1種子当たり 1×10^5 cfu/mlの値にとどまり、接種時の菌量とほぼ同じ値であった。また、発病抑制効果を示さない非病原性菌株YN7810との混合培養では、病原性菌株2-SRは単独培養の場合と同様に増殖していき、接種後10日目には1種子当たり 1×10^7 cfuの菌量に達した。両非病原性菌株は単独、混合の両培養において10日目まで1種子当たり約 10^7 cfuの菌量で一定していた。このように、発病抑制効果の認められる菌株の組み合わせでは病原性菌株の増殖が非病原性菌株との混合培養によって抑えられる傾向が認められた。

【0046】8. さらに、イネもみ枯細菌病菌は培地中で毒素を産生することが報告されている。しかし、培地中では病原性の有無にかかわらず毒性物質を産生することが明らかとなった。一方、非病原性菌株は土壌中ではイネに対する生育抑制を示さないことから、このイネ及び土壌が関与した条件下で病原性菌株が産生する毒素を非病原性菌株が中和あるいは解毒することにより発病が抑制される可能性も十分に考えられる。このことを明らかにする目的で以下の実験を行った。

【0047】非病原性菌株による毒素の解毒は次の方法により検討した。すなわち、くみあい培土500gに対して蒸留水1,000mlを加え、時々攪拌しながら24時間静置し、吸引濾過によりくみあい培土の水抽出液を得た。これを100mlの三角コルベンに18mlずつ分注し加圧滅菌した。これに3%次亜塩素ナトリウム(アンチホルミン)で表面殺菌した無菌のイネ種子を20粒ずつ加え、病原性菌株2(菌濃度:約 10^8 cfu/ml)の細菌懸濁液を2mlずつ接種し、25℃で34,000~40,000 lux照明下で10日間育苗した。その後イネ種子を取り除き、10,000×g、20分間の遠心を行い、得られた上清を0.2μmのメンブランフィルターで処理し、完全に除菌した病原性菌株2の培養濾液を得た。この培養濾液を2mlずつ滅菌試験管に入れ、これにYPD A斜面培地で30℃、48時間培養した非病原性菌株N7503を約 10^9 cfu

22

/mlになるように接種し、25℃で培養した。培養10日目に、10,000×g、20分間の遠心により培養濾液からの菌体を除き、0.2μmのメンブランフィルターを通すことにより完全に除菌し、得られた濾液を2mlずつ滅菌試験管に分注、これに表面殺菌したイネ種子を2粒ずつ入り、25℃、34,000~40,000 luxの条件下で育苗し、10日目に幼苗長及び根長を測定し、解毒の有無を調べた。

【0048】この結果、病原性菌株2の培養濾液では幼苗長6.8mm、根長1.0mmと強い生育阻害が認められたのに対して、これに非病原性菌株N7503を接種し10日間培養した濾液では幼苗長91.6mm、根長83.0mmと、対照区とほぼ同様の生育を示し、毒素の活性が著しく低下している事が明かとなった。

【0049】次に本発明の実施例を示す。

【実施例1】シュードモナス グルメN7503菌株を約 10^{10} cfu/mlの菌体濃度になるように滅菌蒸留水に懸濁し、これにメチルセルロースを1.5%になるように加えた。この懸濁液100mlに、イネ種子あそみのり60粒を30℃で24時間浸漬した。この種子を120℃で30分間滅菌したくみあい培土(三井東圧社製)約80gの入った容器に播種し、20g覆土した後、病原性菌株の懸濁液(約 10^8 cfu/ml)を10ml灌注した。15日経過したが発病は観察されなかった。一方、N7503菌株を接種しなかった種子について、同様の試験を行った結果、これらは全て発病した。

【0050】

【実施例2】120℃で30分間滅菌した土壌に、シュードモナス グルメN7503菌株を 6.3×10^8 cfu/g-土壌及び病原性シュードモナス グルメを 2.3×10^8 cfu/g-土壌になるように散布、混合した。この土壌にあそみのり種子を播種した。種子は、その後、発芽し、生育したが発病は観察されなかった。一方N7503を混合せず、病原性菌のみを混入した区では、全て発病した。

【0051】

【実施例3】イネ品種あそみのりを播種し、その26日目に、ワグネルポットに5株ずつ移植して生育させ、移植後85日目の開花期に、シュードモナス グルメN7503菌株の懸濁液(菌体濃度 2.5×10^{10} cfu/ml)及び病原性菌株の懸濁液(So-1菌体濃度: 2.5×10^8 cfu/ml、Ku8111菌体濃度: 1.7×10^8 cfu/ml)の混合液(1:1)、または前記N7503菌株の懸濁液2倍希釈液或いは前記病原性菌株の懸濁液2倍希釈液を、それぞれ1ポット当たり50mlずつ噴霧接種した。接種後、3日間ビニールで被覆し、20日目に穂の発病の有無を調査し、罹病株率及び1穂平均罹病度を算出した。この結果を表10に示した。

【0052】

【表10】

接種菌株	罹病株率 (%)	1穂平均罹病度
N7503 の2倍希釈液	0	0
N7503:So-1混合液	40.0	5
N7503:Ku8111混合液	35.0	15
So-1の2倍希釈液	90.0	20
Ku8111の2倍希釈液	90.0	38
ブランク	0	0

【図面の簡単な説明】

疾病の指標0～5 Nは壊死 (necrosis) をCは

【図1】 シュードモナス グルメで惹起されるコメ種子 10 褪緑 (chlorosis) を示す。

【図1】

